

**A 8**

1/5/1 (Item 1 from file: 351)  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2007 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0009037009

WPI ACC NO: 1998-594608/199850

XRAM Acc No: C1998-178403

Composition containing lupin oil optionally with wheat germ oil -  
having  
antioxidant and anti-elastase action, used for cosmetics and food  
supplements

Patent Assignee: LAB EXPANSCIENCE (EXPA-N); LAB PHARMASCIENCE SA  
(PHAS)

Inventor: MONTAUDOIN M; MONTAUDOUIN M G; MSIKA P; RANCUREL A

Patent Family (6 patents, 80 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date
WO 1998047479	A1	19981029	WO 1998FR827	A	19980424
199850 B					
FR 2762512	A1	19981030	FR 19975067	A	19970424
199850 E					
AU 199875352	A	19981113	AU 199875352	A	19980424
199913 E					
EP 914090	A1	19990512	EP 1998922865	A	19980424
199923 E					
			WO 1998FR827	A	19980424
JP 2000514835	W	20001107	JP 1998545177	A	19980424
200059 E					
			WO 1998FR827	A	19980424
US 6146616	A	20001114	WO 1998FR827	A	19980424
200060 E					

US 1998202959 A 19981224

Priority Applications (no., kind, date): FR 19975067 A 19970424

#### Patent Details

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
WO 1998047479	A1	FR	43	0	
National Designated States,Original: AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GE GH GM GW HU ID IL IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL					

TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZW

Regional Designated States,Original: AT BE CH CY DE DK EA ES FI  
FR GB GH

GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA	PT SD SE SZ UG ZW
AU 199875352	A EN
1998047479	Based on OPI patent WO

EP 914090	A1 FR	PCT Application WO 1998FR827
		Based on OPI patent WO

1998047479

Regional Designated States,Original:	BE DE DK ES GB IT NL PT SE
JP 2000514835	W JA 38
	PCT Application WO 1998FR827
	Based on OPI patent WO

1998047479

US 6146616

A EN

PCT Application WO 1998FR827  
Based on OPI patent WO

1998047479

Alerting Abstract WO A1

Antioxidant and/or antielastase composition contains lupin oil or  $\geq 1$  fraction of lupin oil, optionally with wheatgerm oil or  $\geq 1$  fraction of wheatgerm oil.

The composition is preferably in the form of creams, emulsions, pomades, sticks or gels and contains 0.5-10 (especially 1-5) wt.% lupin oil and wheatgerm oil. The lupin oil is preferably obtained from lupinus albus seeds or flour and is solvent extracted (e.g. using hexane) and the resultant oil may undergo molecular distillation to give an oil having 30 - 70 (preferably 45-65) wt.% unsaponifiable material which may be concentrated by saponifying the mixture (potassium hydroxide in aqueous alcohol) and eliminating salts by countercurrent extraction. The residue contains 3% sterols and 40% tocopherols.

USE - The topically applied composition is used for protecting skin against damage due to external influences (UVA, UVB, infrared and pollutants) and the effects of ageing (wrinkles and loss of skin firmness). The composition may be used in food supplements as antioxidants.

Title Terms/Index Terms/Additional Words: COMPOSITION; CONTAIN; LUPIN; OIL;

OPTION; WHEAT; GERM; ANTIOXIDANT; ANTI; ELASTASE; ACTION; COSMETIC; FOOD; SUPPLEMENT

Class Codes

International Classification (Main): A61K-035/78, A61K-007/42, A61K-007/48

(Additional/Secondary): A23L-001/30, A61K-031/00, A61K-031/05, A61K-007/00, A61K-007/40

US Classification, Issued: 424059000, 424400000, 424401000

File Segment: CPI

DWPI Class: B04; B07; D13; D21

Manual Codes (CPI/A-M): B04-B01C; B12-M06; B14-E11; B14-N17; B14-R01;

B14-R05; D03-H01P; D08-B11

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 762 512**

②① N° d'enregistrement national :

**97 05067**

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : A 61 K 7/48, A 61 K 7/42, 35/78

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②② Date de dépôt : 24.04.97.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 30.10.98 Bulletin 98/44.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES PHARMASCIENCE  
SOCIÉTÉ ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : RANCUREL ALAIN, MONTAUDOUIN  
MARIE GEORGETTE et MSIKA PHILIPPE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ COMPOSITIONS A BASE D'HUILE DE LUPIN, NOTAMMENT A BASE D'HUILE DE LUPIN ET D'HUILE DE  
GERME DE BLE ET LEUR UTILISATION EN COSMÉTOLOGIE, EN PHARMACIE ET EN TANT QUE  
COMPLÉMENT ALIMENTAIRE.

⑤⑦ La présente invention concerne une composition con-  
tenant de l'huile de lupin ou une ou plusieurs fractions de  
celle-ci, son utilisation en cosmétologie, en pharmacie et en  
tant que complément alimentaire. Elle concerne plus parti-  
culièrement une composition comprenant un mélange d'huile  
de lupin et de concentrat d'huile de germe de blé, de  
préférence dans une proportion en poids de 70 % d'huile de  
lupin et 30 % de concentrat d'huile de germe de blé.

FR 2 762 512 - A1



1  
COMPOSITIONS A BASE D'HUILE DE LUPIN, NOTAMMENT A BASE  
D'HUILE DE LUPIN ET D'HUILE DE GERME DE BLE ET LEUR  
UTILISATION EN COSMETOLOGIE, EN PHARMACIE ET EN TANT QUE  
COMPLEMENT ALIMENTAIRE

5

La présente invention a pour objet de nouvelles compositions à base d'huile de lupin, ou de fractions de celle-ci, notamment des concentrats et des insaponifiables.

10 L'huile de lupin peut être extraite notamment à partir de farines et/ou de graines de lupin.

Le lupin est un proche parent du pois, de la fève, du soja et du haricot. La graine est traditionnellement employée en alimentation humaine pour sa forte teneur en protéines. Il est également incorporé dans l'alimentation des ruminants sous forme  
15 de la plante entière ou de ses graines et aussi fréquemment utilisé comme engrais vert. Plus particulièrement, quatre espèces de lupin présentent un réel intérêt agronomique : le lupin blanc (*lupinus albus*), le lupin bleu (*lupinus angustifolius*), le lupin jaune (*lupinus luteus*) et le lupin changeant (*lupinus mutabilis*).

Les végétaux constituent une source lipidique abondante et l'extraction  
20 d'huile végétale a déjà été largement réalisée. L'huile peut être alors utilisée directement, ou sous forme de certaines de ses fractions. Parmi les fractions susceptibles d'être obtenues à partir d'une huile végétale, on peut citer les insaponifiables ou encore les concentrats.

Selon la Pharmacopée Européenne, 2<sup>ème</sup> édition, page V.3.4.7 ; le terme  
25 « insaponifiable » s'applique aux substances, non volatiles, obtenues par extraction, avec un solvant organique d'une solution de la substance à examiner après saponification d'une huile végétale ou animale.

Par ailleurs, la méthode dite de distillation moléculaire permet de concentrer des huiles, issues notamment de plantes (huiles végétales) et d'obtenir des  
30 concentrats dans lesquels la concentration en insaponifiables peut atteindre par exemple de l'ordre de 10 % à 20 % en poids, voir même plus, cette concentration étant de l'ordre de 1% à 2% en poids dans les huiles de départ.

Des huiles végétales ont ainsi fait l'objet d'utilisations diverses, essentiellement en cosmétologie. Par exemple, le brevet FR 92 07830 décrit la préparation de compositions à base de fractions insaponifiables d'huiles de germe de blé et de sésame pour un usage cosmétique, ces concentrats étant obtenus par  
5 distillation moléculaire selon une méthode préférentielle décrite au brevet.

Jusqu'à présent, la préparation d'huile de lupin ou de ses fractions, par exemple concentrat ou fraction insaponifiable, n'avait pas été envisagée.

Les inventeurs ont maintenant préparé, et c'est là que réside l'invention, de nouvelles compositions contenant de l'huile de lupin ou une ou plusieurs fractions de  
10 celle-ci.

L'huile de lupin peut être extraite à partir de farines et/ou de graines de lupin.

Les inventeurs ont constaté que, de façon surprenante, ces compositions présentaient un certain nombre de propriétés ouvrant la voie à des applications variées dans le domaine cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire.

15 Les études à la base de l'invention ont permis de mettre en évidence que l'huile de lupin ou ses fractions exerce une activité antiradicalaire.

La présente invention vise plus particulièrement des compositions comprenant de l'huile de lupin sous forme d'une fraction constituée par un concentrat d'huile de lupin obtenu par distillation moléculaire de l'huile de lupin.

20 Selon un autre aspect, les compositions à base d'huile de lupin selon l'invention comprennent une ou plusieurs fractions d'huile de lupin sous forme d'insaponifiable tel que contenu dans un concentrat d'huile de lupin.

Avantageusement, la quantité en poids de la fraction insaponifiable dans le concentrat d'huile de lupin est d'environ 30 % à environ 70 %, de préférence  
25 d'environ 45 % à environ 65 % et de façon encore plus préférée, de l'ordre de 60 %.

Les inventeurs ont constaté que l'huile de lupin possède une teneur particulièrement élevée en dérivés polyphénoliques,  $\beta$ -carotène et tocophérols et il est connu que les dérivés polyphénoliques contribuent à la stabilité à l'oxydation d'une composition les contenant. C'est pourquoi, avantageusement, l'invention a  
30 pour objet une composition contenant des dérivés phénoliques extraits de l'huile de lupin. En particulier, cette composition contient une fraction d'huile de lupin

contenant des dérivés phénoliques. De préférence, la teneur en dérivés phénoliques est au moins égale à 20 ppm.

L'invention a également pour objet une composition dans laquelle l'huile de lupin ou ses fractions sont en mélange avec de l'huile de germe de blé ou une ou  
5 plusieurs de ses fractions. Dans ce cas, la fraction d'huile de germe de blé utilisée peut être également un concentrat obtenu par distillation moléculaire de ladite huile ou encore une fraction insaponifiable contenue dans un tel concentrat. De façon  
surprenante, les inventeurs ont maintenant établi que l'huile de germe de blé ou ses fractions pouvait avantageusement être utilisée en combinaison avec l'huile de lupin  
10 ou ses fractions.

De préférence, lorsque les deux types d'huile sont présents dans une composition selon l'invention, l'huile de lupin est en mélange avec un concentrat d'huile de germe de blé.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les quantités en poids de  
15 concentrat d'huile de germe de blé et d'huile de lupin varient respectivement entre environ 10 % et environ 90 % et entre environ 90 % et environ 10 % de manière à ce que le total des quantités de ces deux huiles fasse 100 %.

De façon surprenante, on a par ailleurs constaté que dans un certain rapport de composition, l'activité antiradicalaire était nettement meilleure.

20 C'est pourquoi, une composition préférée selon l'invention, est celle dans laquelle les quantités en poids du concentrat d'huile de germe de blé et d'huile de lupin sont respectivement de 30 % et 70 %.

L'invention concerne également l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention, notamment comme agent anti-radicalaire, anti-élastase, protecteur  
25 UVA et/ou B, protecteur de l'ADN contre des dommages, notamment oxydatifs. Grâce aux activités mises en évidence pour les compositions selon l'invention, il est possible d'utiliser les compositions selon l'invention, à titre cosmétique ou pharmaceutique, notamment pour la photoprotection, contre le vieillissement actinique ou non, et pour la protection de la peau contre des agressions oxydantes y  
30 compris la pollution.

L'invention a également pour objet une composition cosmétique comprenant une composition telle que décrite précédemment. Les compositions cosmétiques ainsi

définies, sont susceptibles d'être utilisées notamment en tant que produit solaire protecteur des UVB et/ou A et/ou rayonnement infra-rouge, crème restructurante, raffermissante, produit, notamment crème pour la prévention et la régression des vergetures, crème nutritive, antiride (lutte contre le vieillissement de la peau  
5 épiderme et derme) et protectrice de jour, contour des lèvres et des yeux, sticks labiaux régénérants et protecteurs de préférence en association avec un véhicule physiologiquement acceptable. Pour ces utilisations, les compositions cosmétiques selon l'invention sont avantageusement formulées pour un usage topique, notamment sous forme de crèmes, d'émulsions, de pommades, de sticks et de gels.

10 L'invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique comprenant l'application d'une composition selon l'invention sur la surface cutanée d'un individu.

L'invention vise également les compositions selon l'invention, à titre de produit pharmaceutique, et notamment à titre d'agent destiné à la prévention ou au  
15 traitement des effets des UVA et/ou UVB sur la peau, aux niveaux épidermique, dermique, cellulaire ou extracellulaire à titre d'agent ayant une activité inhibitrice de l'élastase, ou à titre d'agent ayant une activité antiradicalaire, ou encore à titre d'agent ayant une activité de protection de l'ADN contre des dommages, notamment des dommages oxydatifs.

20 Dans ce cas, la composition pharmaceutique telle que décrite ci-dessus sera de préférence en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

Les compositions cosmétiques ou pharmaceutiques selon l'invention, peuvent présenter une teneur totale en poids en huile de lupin ou ses fractions et huile de germe de blé ou ses fractions de l'ordre de 0,5 à 10 % environ, de préférence de  
25 environ 1% à environ 5%.

Les compositions selon l'invention présentent également de façon fort avantageuse, une activité anti-oxydante, mise en évidence par la stabilité à l'oxydation notamment de l'huile de lupin et du concentrat correspondant. On peut également citer une application supplémentaire en tant que complément alimentaire  
30 mettant à profit cette activité anti oxydante.



Enfin, l'invention a également pour objet un procédé de préparation des compositions décrites ci-dessus. Différentes variantes sont envisageables selon les compositions. Ainsi, par exemple on peut citer :

- 5       - le mélange de deux concentrats d'huile de lupin et d'huile de germe de blé tels qu'obtenus par la méthode de distillation moléculaire par exemple telle que décrite dans la revue « Parfumerie Cosmétique et Arôme » (1985 , n° 61, page 91-96) ;
- le mélange préalable des huiles de lupin et de germe de blé suivi de la distillation moléculaire du mélange selon le procédé décrit ci-dessus ;
- 10       - le mélange d'huile de lupin et d'un concentrat d'huile de germe de blé obtenu par distillation moléculaire.

Le concentrat d'huile de germe de blé est avantageusement préparé selon le procédé de distillation moléculaire décrit au brevet FR 92 07830. Selon ce procédé, l'huile est étalée en couche mince sur la surface chauffée d'un rotor conique tournant  
15 à grande vitesse. On maintient un vide poussé dans l'enceinte de distillation. Dans ces conditions, il y a évaporation et non pas ébullition, depuis la surface chaude, des constituants de l'insaponifiable dont la séparation devient possible par rapport aux glycérides, l'avantage étant que l'huile et l'insaponifiable, réputés fragiles, ne sont pas dégradés au cours de l'opération.

20       L'invention sera davantage détaillée dans les exemples de réalisation qui suivent qui illustrent la préparation d'huile de lupin et de concentrat d'huile de germe de blé, séparément ou en mélanges, de formulations de compositions à base de tels mélanges et d'indications de leurs activités.

## 25    **I. Exemples de préparation d'huile de lupin et d'insaponifiable d'huile de lupin**

### EXEMPLE 1 : L'huile de lupin

On utilise des graines issues de semences certifiées, commercialisées par la  
30 société CANA.

Après un pré-nettoyage, les graines sont soigneusement nettoyées (élimination des graines et particules étrangères résiduelles, des graines cassées), et peuvent être décortiquées.

Elles sont aplaties dans un broyeur à cylindres ; après conditionnement  
5 hydrothermique à une température de 70°C environ, leur humidité varie entre 5% et 10 %.

L'extraction de l'huile est alors réalisée dans un extracteur par percolation à l'hexane. L'extracteur étant rempli d'écailles broyées, l'extraction est réalisée par 4 à 6 lavages à l'hexane pour chaque charge.

10 Après chaque lavage, le miscella est pompé vers un distillateur ; après l'égouttage suivant le dernier lavage, le tourteau est envoyé vers un désolvant.

Le miscella est distillé en continu dans un distillateur chauffé par circulation de vapeur ; il est continuellement recyclé dans le distillateur.

A la fin des opérations, l'huile contenant encore de l'hexane est envoyée vers  
15 la distillation finale pour éliminer l'hexane sous vide (de 10mm à 35mm de mercure) entre 70°C et 100°C par « stripping » (strippage) pendant 10 mn.

La composition d'une huile brute extraite de graines selon le procédé ci-dessus est indiquée ci-après :

20 - Caractères organoleptiques : huile de couleur jaune orangé, d'odeur caractéristique.

- Composition en acides gras :

	. Acide myristique C14	≤ 0,50 %
	. Acide palmitique C16	4 à 10 %
	. Acide palmitoléique C16'	≤ 2%
25	. Acide stéarique C18	≤ 4%
	. Acide oléique C18'	45 à 65 %
	. Acide linoléique C18''	9 à 17 %
	. Acide linolénique C18'''	5 à 11 %
	. Acide arachidique C20	≤ 3%
30	. Acide gadoléique C20'	2 à 8%
	. Acide béhénique C22	≤ 6%
	. Acide érucique C22'	≤ 5%

	. Acide lignocérique C24	$\leq 2\%$
	- Teneur en insaponifiable	$\geq 1,5\text{g}/100\text{g}$
	- Teneur en carotènes (en mg/100g)	$\geq 25\text{mg}/100\text{g}$
	- Teneur en tocophérols	$\geq 0,1\text{g}/100\text{g}$
5	- Teneur en dérivés phénoliques (en équivalent d'acide gallique)	$\geq 20 \text{ ppm}$
	- Teneur en alcool triterpénique (alpha-lupéol)	0,1 à 1%
	- Teneur en stérols totaux :	$\geq 0,8\text{g}/100\text{g}$
	. % relatif en campésterol	18 à 24 %
10	. % relatif en stigmasterol	5 à 10 %
	. % relatif en $\beta$ sitostérol	48 à 65 %
	. % relatif en delta 5 - avenastérol	< 5%

**EXEMPLE 2 :** Préparation d'un concentrat d'huile de lupin par distillation  
15 moléculaire

La distillation moléculaire est réalisée par étalement de l'huile en couche mince sur la surface chauffée d'un rotor conique tournant à grande vitesse. On maintient un vide poussé dans l'enceinte de distillation. On introduit dans un appareil  
20 de distillation moléculaire approprié et de préférence du style centrifuge, de l'huile de lupin telle qu'obtenue à l'exemple 1. Le débit d'alimentation est de 10 à 30 kg par heure et de préférence entre 15 et 20 kg par heure.

Les paramètres de la distillation sont les suivants :

- température : 210°C à 250°C ;
- 25 - vide de 1 à 10  $\mu\text{m}$  (soit 0,13 à 1,3 Pa).

Le pourcentage distillé étant proche de 10, on recueille soigneusement ce distillat.

La richesse en matière non saponifiable de cette fraction distillée est comprise entre 45 % et 65 %.

30 Les caractéristiques du concentrat ainsi obtenu sont les suivantes :

- Caractères organoleptiques : pâte jaune-orangé

	- Teneur en squalène	≈ 0,2g/100g
	- Teneur en carotènes	≈ 22,0mg/100g
	- Teneur en tocophérols	≈ 9,0g/100g
	. % relatif en alpha tocophérol	≈ 1,0 %
5	. % relatif en gamma tocophérol	≈ 80,0 %
	. % relatif en delta tocophérol	≈ 15,0 %
	- Teneur en stérols totaux	≈ 40,0g/100g
	. % relatif en campésterol	≈ 20,0 %
	. % relatif en stigmastérol	≈ 9,0 %
10	. % relatif en $\beta$ sitostérol	≈ 60,0 %
	. % relatif en delta 5 - avenastérol	≈ 2,0 %
	. % relatif en delta 7 - stigmastérol	≈ 2,0 %
	- Teneur en dérivés phénoliques, exprimée en	
	acide gallique	≈ 40,0ppm
15	- Teneur en insaponifiable total	≈ 60,0 %

### EXEMPLE 3 : Préparation de l'insaponifiable d'huile de lupin

Le concentrat d'huile de lupin obtenu à l'exemple 2 est saponifié dans un réacteur en acier inoxydable, dans les conditions suivantes :

On ajoute, pour 100 kg de concentrat, 20 kg d'hydroxyde de potassium en écailles, 250 kg d'alcool et 30 kg d'eau. On porte le mélange à reflux pendant 5 heures.

La solution hydroalcoolique des savons ainsi obtenue, est diluée de son volume avec de l'eau déminéralisée et extraite par du dichloroéthane (DCE) dans un appareil à contre-courant par exemple une colonne pulsée, qui extrait sélectivement la partie insaponifiable.

Cette solution d'insaponifiable est alors lavée par de l'eau dans un autre appareil à contre-courant de façon à éliminer les savons entraînés lors de l'extraction.

Le DCE est éliminé à raison de 95 % environ, sous pression atmosphérique dans un appareil d'évaporation à flot tombant, puis l'évaporation est terminée dans

appareil sous vide muni d'une double enveloppe et d'un injecteur permettant l'introduction de vapeur vive dans la masse, selon le mode opératoire suivant :

. Le produit est chauffé à 100°C, sous vide de 10mm de Hg (soit 1,3 kPa) jusqu'à cessation de la distillation du dichloroéthane résiduel ; à ce moment, la vapeur  
5 d'eau est injectée dans la masse, à raison de 4% en poids d'eau par rapport au poids d'insaponifiable. La durée de l'opération est d'environ 4 heures.

. Le produit est séché par injection d'azote, en utilisant la tubulure ayant servi à l'introduction de la vapeur.

. Le produit est alors refroidi et le vide est cassé sous courant d'azote.

10 L'insaponifiable est conservé en fût polyéthylène haute densité et sac polyéthylène basse densité sous azote jusqu'à son utilisation.

L'insaponifiable d'huile de lupin ainsi obtenu est une pâte jaune orangé contenant :

- des tocophérols environ 3%

15 . dont environ 96 % de gamma-tocophérol

. et environ 4% d'alpha-tocophérol

- des stérols environ 40 % avec une teneur relative en :

. campéstérol environ 25 %

. stigmastérol environ 8%

20 .  $\beta$  sitostérol environ 52 %

**EXEMPLE 4 : Mélange d'un concentrat d'huile de germe de blé et d'huile de lupin.**

25 On prépare un concentrat d'huile de germe de blé selon le procédé décrit au brevet FR 92 07830 dont le contenu est ici incorporé par référence, et on le mélange avec de l'huile de lupin telle qu'obtenue à l'exemple 1, dans des proportions respectives en poids de 30 % et 70 % par rapport au poids total du mélange. Les caractéristiques du mélange obtenu sont les suivantes :

30

- Caractères organoleptiques : huile limpide de couleur jaune orangé, d'odeur caractéristique.

- Composition en acides gras :		
	. Acide myristique C14	$\leq 2 \%$
	. Acide palmitique C16	7 à 14 %
	. Acide palmitoléique C16'	$\leq 2\%$
5	. Acide stéarique C18	$\leq 5\%$
	. Acide oléique C18'	38 à 52 %
	. Acide linoléique C18''	25 à 30 %
	. Acide linolénique C18'''	4 à 11 %
	. Acide arachidique C20	$\leq 3\%$
10	. Acide gadoléique C20'	2 à 8%
	. Acide béhénique C22	1 à 6%
	. Acide érucique C22'	$\leq 5\%$
	. Acide lignocérique C24	$\leq 2\%$
	- Teneur en insaponifiable	$\geq 4\text{g}/100\text{g}$
15	- Teneur en carotènes (en mg/100g)	$\geq 15\text{mg}/100\text{g}$
	- Teneur en tocophérols	$\geq 500\text{mg}/100\text{g}$
	- Teneur en dérivés phénoliques	$\geq 14 \text{ mg/kg}$
	- Teneur en stérols totaux :	$\geq 2,5 \%$
	. % relatif en campésterol	18 à 25 %
20	. % relatif en stigmastérol	3 à 10 %
	. % relatif en $\beta$ sitostérol	48 à 64 %
	. % relatif en delta 5 - avenastérol	$\leq 6\%$

II. Exemples de formulation (les produits désignés sous des appellations commerciales sont, sauf mention particulière, cités dans l'annuaire INCI ; 6<sup>ème</sup> édition.

### 1. Crème à l'huile de lupin

30	Montanov 68	5,00 %
	Beurre de Karite	3,00 %
	Huile de paraffine	10,00 %

	Cetearyl octanoate	5,00 %
	Diméthicone	1,00 %
	<b>Huile de lupin</b>	<b>5,00 %</b>
	Phénoxyéthanol	0,40 %
5	Phénonip	0,80 %
	Eau	59,10 %
	Glycérine	10,00 %
	Controx VP	0,10 %
	Parfun borealis n°1	0,60 %

10

2. Crème hydratante légère à l'huile de lupin

	Huile de vaseline épaisse	2,00 %
	Octyl dodecanol	2,00 %
15	Cetearyl glucoside	5,00 %
	Huile de jojoba	1,00 %
	Squalane	1,00 %
	Alcool cétostéarylique 25 OE	1,00 %
	Controx VP	0,10 %
20	<b>Huile de lupin</b>	<b>5,00 %</b>
	Eau purifiée	72,475 %
	Citrate trisodique	0,10 %
	Acide citrique monohydrate	0,025 %
	Silicone Q21401*	4,00 %
25	Conservateur GD 700**	0,20 %
	Sepigel 305	0,80 %
	Aloe vera gel	5,00 %
	Parfum composition 53905-1 Synarome	0,30 %

\* Le silicone Q21401 est commercialisé par la société Dow Corning sous la  
30 désignation Cyclométhicone et diméthiconol ;

\*\* Le conservateur GD 700 est commercialisé par la société PHYTOCOS sous :  
propylène glycol, eau, phénoxyéthanol, méthylparaben, butylparaben,  
isobutylparaben, éthylparaben ; méthylchlorothiazolinone et méthylisothiazolinone.

5 **3. Crème au concentrat d'huile de lupin**

	Esters d'acides gras polyoxyéthylénés	4,00 %
	Acide stéarique	3,00 %
	Alcool cétylique	2,00 %
10	Huile de vaseline fluide	2,00 %
	Propylène glycol	2,00 %
	Glycérine	1,50 %
	<b>Concentrat d'huile de lupin</b>	<b>1,00 %</b>
	Polyimidazole urée	0,20 %
15	Parahydroxybenzoate de méthyle	0,20 %
	Parahydroxybenzoate de propyle	0,10 %
	Acide tartrique	0,02 %
	Parfum	0,30 %
	Eau.....q.s.p	100,00 %

20

**4. Crème à l'insaponifiable de lupin**

	Monostearate de sorbitan polyoxyéthyléné	3,20 %
	Octyldodecanol	3,00 %
25	Huile d'amande douce	2,80 %
	Monostéarate de sorbitan	2,00 %
	Huile de vaseline fluide	2,00 %
	Laurate d'hexyle	2,00 %
	Cire d'abeille	2,00 %
30	Alcool cétylique	1,50 %
	Stéarate de diéthylène glycol	1,50 %
	Mélange de monoglycérides d'alcools gras	



	de triglycérides et d'esters cireux	1,00 %
	<b>Insaponifiable de lupin</b>	<b>1,00 %</b>
	Parahydroxybenzoate de méthyle	0,30 %
	Parahydroxybenzoate de propyle	0,10 %
5	Parfum	0,25 %
	Eau.....q.s.p	100,00 %

5. Crème anti-âge avec un mélange comprenant 30 % de concentrat d'huile de germe de blé et 70 % d'huile de lupin

10		
	Arlacel 165	5,00 %
	Cetearyl octanoate	14,00 %
	Palmitate de cetylle	1,00 %
	<b>Concentrat d'huile de germe de blé</b>	
15	<b>et huile de lupin</b>	<b>3,00 %</b>
	Phenonip	0,80 %
	Phenoxyéthanol	0,40 %
	Controx VP	0,10 %
	Eau	72,50 %
20	Sepigel	2,50 %
	Parfum Firmenich petit matin	0,70 %

6. Lait après-soleil avec un mélange comprenant 30 % d'un concentrat d'huile de germe de blé et 70 % d'huile de lupin

25		
	Emulgade SE*	6,00 %
	Miglyol 812	3,00 %
	Cetearyl Octanoate	3,00 %
	Beurre de Karite	2,00 %
30	Alcool cetylique	1,00 %
	<b>Concentrat d'huile de germe de blé et</b>	
	<b>huile de lupin</b>	<b>1,50 %</b>

	Silicone Q2 1401	2,00 %
	Eau	76,90 %
	Glycérine	3,00 %
	Controx VP	0,10 %
5	Phenonip	0,80 %
	Phenoxyéthanol	0,40 %
	Parfum eau marine TM 4509 Technicoflor	0,30 %
* Emulgade SE est commercialisé par la société Henkel sous : Glyceryl stearate, ceteareth-20, ceteareth-12, cetearyl alcohol et cétyl palmitate.		

10

7. Crème solaire avec un mélange comprenant 30 % d'un concentrat d'huile de germe de blé et 70 % d'huile de lupin

	Eau	qsp 100 %
15	Caprylic/Capric Triglyceride	16,10 %
	Dioxyde de titane	10,00 %
	Octyl Palmitate	4,64 %
	Benzoate d'alkyle C12-15	4,00 %
	Cyclomethicone	3,00 %
20	Cetearyl Octanoate	3,50 %
	Cetyl Dimethicone Copolyol	2,50 %
	Oxyde de zinc	2,00 %
	Aluminium/Magnesium Hydroxide Stearate	2,00 %
	Cetyl Dimethicone	1,00 %
25	Acide isostéarique	1,00 %
	Chlorure de sodium	1,00 %
	Phenoxyethanol	0,876 %
	Tocopheryl acetate	0,50 %
	Octyldodecanol	0,28725 %
30	Methylparaben	0,128 %
	Butylparaben	0,048 %

**Concentrat d'huile de germe de blé et**

<b>huile de lupin</b>	<b>2,00 %</b>
-----------------------	---------------

8. Crème solaire avec un mélange comprenant 30 % d'un concentrat d'huile de  
 5 germe de blé et 70 % d'huile de lupin

	Eau	qsp 100 %
	Octyl Methoxycinnamate	7,50 %
	Octyl Cocoate	10,00 %
10	Octyl Salicylate	5,00 %
	Oleth-2	3,00 %
	Benzophenone-3	3,00 %
	Huile de vaseline	1,80 %
	Stearyl Heptanoate	1,425 %
15	Stearamine Oxide	1,30 %
	Acrylates/Octylacrylamide Copolymer	1,30 %
	Sulfate de Magnesium	0,50 %
	Vitamine E	0,50 %
	Sodium Magnesium Silicate	0,40 %
20	Phenoxyethanol	0,053 %
	Methylparaben	0,012 %
	Parfum	0,20 %
	<b>Concentrat d'huile de germe de blé et</b>	
	<b>d'huile de lupin</b>	<b>1,00 %</b>

25

**III. Etude de l'activité antiradicalaire de mélange d'huile de lupin et du**  
**concentrat d'huile de germe de blé : comparaison avec la vitamine E et la**  
**vitamine C associée au glutathion.**

30 **1. Produits testés**

Cinq échantillons référencés ci-après ont été testés :

. L0 : huile de germe de blé

. L50 : mélange de 50 % de concentrat d'huile de germe de blé et 50 % d'huile de lupin

. L70 : mélange de 30 % de concentrat d'huile de germe de blé et 70 % d'huile de lupin

5 . L90 : mélange de 10 % de concentrat d'huile de germe de blé et 90 % d'huile de lupin

. L100 : huile de lupin pure

L'activité de ces cinq lots a été comparée à celle de l'acétate de vitamine E (Sigma), d'une association ascorbate de sodium (vitamine C) et glutathion (Sigma),  
10 ainsi qu'à celle de la  $\beta$ -carotène à 30 % en solution dans un glycéride synthétique (Référence 1) et à celle d'un mélange de 50 % en poids de concentrat d'huile de germe de blé et 50 % en poids de concentrat d'huile de sésame (tel que décrit au brevet FR 92 07830) (Référence 2).

## 15 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Cultures cellulaires

Les cellules sont des kératinocytes épidermiques humains. On s'est procuré des kératinocytes à partir d'un déchet opératoire résultant d'une intervention de  
plastie mammaire réalisée chez une femme âgée de 40 ans (donneur BIOPREDIC  
20 n° VACHL0009). Les cellules sont utilisées au sixième passage, elles sont  
ensemencées à  $1 \times 10^5$  cellules par puits dans des plaques de culture de 6 puits. Elles  
sont utilisées à confluence.

### 2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire

25 Elle est quantifiée par une méthode fluorométrique qui met en évidence le  
taux d'hydroperoxydes qui sont des métabolites des radicaux libres. On utilise une  
sonde appropriée qui se transforme en un dérivé fluorescent en leur présence, selon la  
méthode décrite par Keston A.S. and Brandt R. (The fluorometric analysis of  
ultramicro quantities of hydrogen peroxide, Anal. Biochem. 11, 1965, 1-5).

30

### 2.3. Irradiation aux U.S.A. et observations des effets de l'irradiation

Les radicaux libres sont générés au niveau de la culture cellulaire par irradiation par les rayonnements ultraviolets A. Les kératinocytes sont irradiés par des rayons UVA du côté inférieur de la monocouche (pour éviter les éventuels effets  
5    filtres des produits à l'essai) à l'aide d'une table à ultraviolets (VILBERT  
  LOURMAT) pendant 90 minutes (10 J/cm<sup>2</sup>)

Les produits à l'essai ainsi que les deux produits de référence, référence 1 et référence 2, sont solubilisés dans du diméthylformamide (DMF).

Les produits à l'essai, L0, L50, L70, L90 et L100 sont testés à des concentrations de 0,000001 ; 0,00001 ; 0,0001 ; 0,001 et 0,01 % (p/v) (soit 1 ; 10 ;  
10    100 ; 1000 et 10000 ppm) dans le tampon HBSS (solution saline de Hacks) contenant 0,04 % (v/v) de DMF.

La concentration en DMF est maintenue constante à 0,04 % (v/v) dans chaque dilution.

Les références 1 et 2 sont testées à 0,01 % (p/v) dans le tampon HBSS  
15    contenant 0,04 % (v/v) de DMF.

Le mélange vitamine C à 0,5 mg/ml + glutathion à 0,5 mg/ml et l'acétate de vitamine E à 0,1 % (p/v) sont directement solubilisés dans le tampon HBSS.

La sonde destinée à mettre en évidence les hydroperoxydes (sonde CM-H2DCF-DA commercialisée par MOLECULAR PROBES) a été utilisée à 5µM dans  
20    le milieu d'essai.

Les kératinocytes sont incubés à températures ambiante avec les produits à l'essai et les produits de référence pendant l'irradiation, soit 90 minutes.

#### 2.4. Témoins

25    Des kératinocytes témoins irradiés (+UVA) ou non irradiés (-UVA) par des rayons UVA sont incubés dans le tampon HBSS (avec témoin (DMF) ou sans (DMF) à 0,04 % (v/v)) et contenant seulement la sonde pendant la durée de l'irradiation.

Après irradiation, les kératinocytes sont lysées par action des ultrasons. Les lysats cellulaires sont transférés dans des plaques de 96 puits et analysés par  
30    fluorimétrie à l'aide d'un analyseur de plaques (excitation : 355 nm, émission : 460 nm).

Les résultats sont exprimés en unité de fluorescence / puits de culture

### 3. Résultats

Les groupes de données (groupe de témoin et groupes traités) ont été comparés par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1), suivie par un test de Dunnett.

Le pourcentage de protection des produits à l'essai ou des produits de référence R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = \frac{\left[ \begin{array}{c} \text{Valeur moyenne obtenue} \\ \text{avec le témoin irradié} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Valeur moyenne obtenue} \\ \text{avec les produits à l'essai} \\ \text{ou les produits de référence} \end{array} \right]}{\left[ \begin{array}{c} \text{Valeur moyenne obtenue} \\ \text{avec le témoin irradié} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Valeur moyenne obtenue} \\ \text{avec le témoin non irradié} \end{array} \right]} \times 100$$

Par convention, lorsque les valeurs mesurées en présence des produits à l'essai ou en présence des produits de référence étaient inférieures à celles du « témoin non irradié », le pourcentage de protection a été rapporté à 100 %. De même, lorsque ces valeurs étaient supérieures à celles du « témoin irradié », le pourcentage de protection a été rapporté à 0%.

Les tableaux ci-après (Tableaux 1 à 7) présentent les résultats obtenus exprimés en % de protection.

**Tableau 1**

	témoin - UVA	témoin + UVA	vitamine C + glutathion	acétate de vitamine E	réf 1 0,01 % (p/v)	réf 2 0,01 % (p/v)
% de protection	100	0	100	65	62	93

**Tableau 2**

	Témoins DMF - UVA	Témoins DMF + UVA	L 0 (% p/v)				
			0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
% de protection	100	0	64	56	96	28	23

**Tableau 3**

5

	Témoins DMF - UVA	Témoins DMF + UVA	L 50 (% p/v)				
			0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
% de protection	100	0	38	60	66	17	58

**Tableau 4**

	Témoins DMF - UVA	Témoins DMF + UVA	L 70 (% p/v)				
			0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
% de protection	100	0	51	95	86	0	0

10 **Tableau 5**

	Témoins DMF - UVA	Témoins DMF + UVA	L 90 (% p/v)				
			0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
% de protection	100	0	8	64	56	60	27

**Tableau 6**

	Témoin DMF - UVA	Témoin DMF + UVA	L 100 (% p/v)				
			0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
% de protection	100	0	24	26	33	79	87

Les résultats reportés aux Tableaux 1 à 6 permettent de tirer les conclusions  
5 suivantes :

- Le DMF à 0,04 % (v/v) utilisé comme solvant intermédiaire des produits à tester et des produits de référence (réf. 1 et réf. 2) n'a pas d'effet significatif vis à vis de l'intensité de la fluorescence émise par la sonde, avant et après irradiation des cellules.
- 10 - Les deux produits de référence vitamine C + glutathion d'une part et acétate de vitamine E d'autre part, présentent un effet protecteur attendu de 100 % et 65 % respectivement vis à vis de l'effet délétère des rayons UVA.
- Les produits de référence, réf. 1 et réf. 2 testés à 0,01 % (p/v) présentent un effet protecteur de 62 % et 93 % respectivement vis à vis de l'effet délétère des  
15 rayons UVA.

En ce qui concerne les produits à tester, on observe les résultats suivants :

- un effet protecteur est obtenu avec les produits L 0, L 50, L 70, L 90 et L 100 vis à vis des effets délétères des rayons UV riches en UVA.
- le produit L 0 (100 % de concentrat d'huile de germe de blé) est plus  
20 protecteur aux faibles concentrations testées qu'aux fortes concentrations.
- un effet inverse est observé pour le produit L 100 (100 % d'huile de lupin).
- les mélanges L 50 et L 90 ne sont pas meilleurs que les produits L 0 et L 100.
- 25 - par contre, de façon inattendue, le produit L 70, notamment à une concentration de 0,0001 % (p/v) est significativement plus protecteur que les quatre autres produits.



#### IV. Etude de l'activité anti élastase du produit L 70 et d'une référence anti élastase dans un modèle d'explant de peau humaine.

L'étude de l'activité anti élastase représente un bon indice du vieillissement de la peau puisqu'il est maintenant bien connu que la dégradation des fibres élastiques présentes dans le derme met en jeu des élastases endogènes. Le test utilisé permet d'étudier l'activité anti élastase in vitro dans des coupes d'explant de peau humaine. Une application d'élastase purifiée sur une partie limitée de la coupe s'accompagne d'une dégradation des fibres élastiques endogènes. Les fibres élastiques sont colorées par la (+) catéchine. Le pourcentage de fibres élastiques intactes par champ optique est évalué par analyse d'images. Un produit présentant une activité anti élastase permet de conserver l'intégrité des fibres élastiques en présence d'élastase purifiée.

##### 15 1. Produits testés

Le produit L 70 testé précédemment pour son activité anti radicalaire a été comparé à des produits anti élastase de référence : l'élastinal (Sigma), le chlorure de mercure (Sigma), et une référence anti élastase (aosaïne).

##### 20 2. Matériels et Méthodes

###### 2.1. Réactifs

On utilise une élastase pancréatique (type IV, référence E0258, Sigma). Le milieu d'incubation des coupes de peau humaine (« véhicule ») est le tampon Hépés 0,1 M, ajusté à pH 7.5 avec la soude et contenant 0,1 M de chlorure de sodium.

25

###### 2.2. Système d'essai

Les coupes de peau sont réalisées à partir d'un déchet opératoire recueilli après une plastie abdominale. Le donneur était une femme âgée de 37 ans. On réalise des explants de 1 cm de diamètre et on les dépose sur un support de liège et on les congèle à -80°C. On réalise des coupes transverses de 6  $\mu$ m d'épaisseur avec un cryomicrotome. Les coupes sont fixées sur des lames de verre et maintenues hydratées avec le véhicule pendant l'essai.

### 2.3. Préparation des produits à tester et des produits de référence, incubation avec le système d'essai

Les produits à tester, le sont à 0,5 ; 1 et 5 % (v/v) dans le véhicule.

5 L'élastatinal est testé à 0,01 et 0,1 % (p/v) dans le véhicule.

Le chlorure de mercure est testé à 0,025 et 0,125 % (p/v) dans le véhicule.

Les dilutions des produits à tester et des produits de référence sont déposées sur les coupes de peau, à raison de 100  $\mu$ l par coupe (0,32 cm<sup>2</sup> de surface), et pré-incubées pendant dix minutes à 37°C. Des bandes de papier filtre (0,16 cm<sup>2</sup> de surface) imbibées de véhicule seul (témoin véhicule) ou contenant de l'élastase pancréatique à 5 unités internationales (UI)/ml (témoin enzyme) sont déposées sur les coupes. Les lames sont placées en chambre humide à 37°C pendant trois heures.

### 15 2.4. Evaluation de l'activité anti élastase

Après l'incubation, les coupes sont rincées avec le milieu d'incubation et colorées par la (+) catéchine. L'activité de l'enzyme en absence et en présence des produits à tester ou des produits de référence est évaluée par analyse d'image : l'image des coupes colorées est digitalisée sur un écran vidéo ; un logiciel d'analyse d'image permet de mesurer les niveaux de gris des images binarisées ; on mesure la surface occupée par les fibres élastiques intactes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fibres élastiques intactes par champ optique.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité élastase des produits à l'essai et des produits de référence est calculé à l'aide de la formule suivante :

25

30

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\left[ \begin{array}{c} \text{Valeur obtenue avec le} \\ \text{témoin enzyme} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Valeur obtenue avec les} \\ \text{produits à l'essai ou les} \\ \text{produits de référence} \end{array} \right]}{\left[ \begin{array}{c} \text{Valeur obtenue avec le} \\ \text{témoin véhicule} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{Valeur obtenue avec le} \\ \text{témoin enzyme} \end{array} \right]} \times 100$$

Les résultats sont montrés au tableau ci-après (Tableau 7).

**Tableau 7**

Produit	Concentration % (v/v)	% d'inhibition
Témoin véhicule	-	100
Témoin enzyme	-	0
Chlorure de mercure	0,025	18,4
	0,125	39,3
Elastatinal	0,01	71,5
	0,1	59,9
Référence anti-élastase (aosaïne)	0,5	32,8
	1	18
	5	68,13
L 70	0,5	31
	1	70
	5	70

5

Le calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité élastase donne de façon attendue 100 % en absence d'élastase (témoin véhicule) et 0% en présence d'élastase (témoin enzyme).

L'élastatinal, testé à 0,01 et 0,1 % (p/v) inhibe respectivement de 71 % et 60 % l'activité de l'élastase. Les fibres d'élastine sont en grande partie intactes dans la zone d'application de l'élastase.

Le chlorure de mercure, testé à 0,025 et 0,125 % (v/v), inhibe respectivement de 18 % et 39 % la dégradation des fibres d'élastine par l'élastase.

La référence anti-élastase, testée à 0,5 ; 1 et 5% (v/v), inhibe respectivement de 33 %, 18 % et 68 % la dégradation des fibres d'élastine par l'élastase.

L 70, testé à 0,5 ; 1 et 5% (v/v), inhibe respectivement de 31 %, 70 % et 70 % la dégradation des fibres d'élastine par l'élastase.

Ainsi, il apparaît que les produits Référence anti-élastase et L 70 testés à 0,5 ; 1 et 5% (v/v) présentent une activité anti-élastase. Le produit L 70 est actif à des concentrations plus faibles que « Référence anti-élastase ».

5 **V. Etude de l'activité anti oxydante d'une composition à base d'huile de lupin ou de ses fractions.**

L'activité anti oxydante est évaluée par le test au Rancimat. Ce test représente une adaptation du test de Swift pour être automatisé sur un appareil  
10 Rancimat (une version du test au Rancimat est commercialisée par la Société METROHM, Suisse).

Le tableau ci-après (Tableau 8) indique les résultats de stabilité au Rancimat 98°C, 20l/h) pour des compositions selon l'invention et, à titre de comparaison, pour d'autres huiles d'origine végétale.

15

**Tableau 8**

ECHANTILLONS ANALYSES	RESULTATS
Huile de lupin	60,4 h
Huile de tournesol	environ 10 h
Huile de maïs	18,2 h
Huile de sésame	20,7 h
Concentrat d'huile de lupin	> 75 h

**VI. Etude de l'effet protecteur de l'ADN.**

20

On a également observé que les compositions selon l'invention avaient un effet protecteur sur l'ADN testé en utilisant un système générateur d'espèces oxygénées réactives induisant la formation de lésions sur l'ADN. Ce test a permis de mettre en évidence, en particulier pour la composition à base de 30 % de  
25 concentrat d'huile de germe de blé et de 70 % d'huile de lupin (L70), une inhibition significative des dommages créés par une espèce oxygénée réactive

(ROS), l'oxygène singulet  $O_2$  généré par éclaircissement du bleu de méthylène, révélatrice de l'effet protecteur.

### 1. Produits testés

- 5 Les produits de l'invention L70, L100, sont comparés à l'huile de lupin raffinée et à un témoin ( $\beta$  carotène à 3mg/100g).

### 2. Principe du test utilisé

- Le test utilisé est un système biologique de détection de dommages (essai 3-  
10 D) sur de l'ADN capté sur microplaque (Analytical Biochemistry, 1995, 232, 37-42). Les dommages sont reconnus par les enzymes de réparation et réparés par des extraits cellulaires purifiés. La réparation des lésions implique une phase d'excision puis de resynthèse du fragment d'ADN endommagé et excisé. Au cours de l'étape de synthèse réparatrice, un (ou des) nucléotide(s) modifié(s) (dUTP digoxigényle ou DIG-11-dUTP) est (sont) incorporé(s) dans l'ADN. Ces nucléotides sont ensuite  
15 reconnus par anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline. Un substrat de la phosphatase alcaline (Lumi-Phos 530) est ensuite ajouté et le signal luminescent émis est mesuré par un luminomètre (Lumax 2, commercialisé par la société S.F.R.I.). L'intensité du signal recueilli est fonction de différents paramètres  
20 (extraits, concentration en sels, quantité d'ADN, temps de réaction...) dont celui relatif au nombre de lésions réparées, donc de lésions présentes sur l'ADN. Une relation dose-réponse est observée dans la limite de 1 à 15 lésions pour 6 kilobases pour la plupart des lésions.

- Ce système est susceptible de réparer tout type de lésion puisque toutes les  
25 enzymes de réparation des lésions de l'ADN sont présentes et actives dans les extraits. Les dommages oxydatifs sont donc reconnus dans ce système.

- Les dommages sont créés par des espèces oxygénées réactives (ROS) au moyen d'un système qui induit la formation de lésions sur l'ADN adsorbé dans un puits, conduisant à la lecture d'un signal de synthèse réparatrice. En présence d'un  
30 composé ou d'un mélange de composés permettant de protéger l'ADN, du fait par exemple de propriétés antioxydantes ou antiradicalaires, on observe une

diminution, voire une abolition du signal de réparation, reflet de la quantité de lésions.

On génère, par éclaircissement du bleu de méthylène, le ROS  $^1\text{O}_2$ , puissant électrophile qui possède une durée de vie très courte. Il réagit donc très rapidement avec des bases de l'ADN et produit des dommages divers de type modification de bases ou perte de bases, très génotoxiques.

### 3. Matériels et Méthodes

#### 3.1. Matériel

Les réactifs utilisés sont décrits dans l'article Analytical Biochemistry, 1995, 232, 37-42.

Le signal chimioluminescent est détecté à l'aide d'un luminomètre lumax 2 commercialisé par la société S.F.R.I.

#### 3.2. Méthodes

##### 3.2.1. Adsorption de l'ADN cible dans les puits de microplaque

On met en contact de l'ADN plasmidique (pBS) ultrapurifié (forme superenroulée majoritaire) avec les puits sensibilisés par de la poly-lysine pendant 30 minutes à 30°C sous agitation légère à une concentration de 1 µg/ml dans un volume de 50 µl. Dans ces conditions, l'adsorption de l'ADN est quantitative (environ 40 ng par puits).

On ajoute un contrôle positif de réparation consistant en un plasmide préendommagé aux UV-C (appelé pBS<sup>UV</sup>).

Après l'incubation, les puits sont lavés 2 fois avec une solution de PBS additionnée de Tween 20 à 0,1 %.

##### 3.2.2. Génération de ROS par éclaircissement de bleu de méthylène

Une solution stock de bleu de méthylène à 10 µg/ml est diluée à une concentration de 4 ng/ml dans de l'eau ultrapure (qualité MilliQ de Millipore).

Cette solution est mélangée à volume égal avec différentes dilutions des échantillons, et 50 µl du mélange (à 2 ng/ml de bleu de méthylène) sont ajoutés

dans les puits contenant l'ADN plasmidique adsorbé. Les puits sont posés sur la glace et éclairés 20 minutes par 2 lampes de 100W, distantes de 30 cm.

### 3.2.3. Dilutions des échantillons à tester dans le test de protection de l'ADN

5 Les quatre échantillons ont été testés à 3 dilutions. Les résultats sont présentés au Tableau 9.

Les dilutions ont été réalisées 2X, dans du propylène glycol, afin d'obtenir les dilutions voulues après addition d'un volume de solution de bleu de méthylène de 4 ng/ml.

10 Afin de vérifier que l'abaissement du signal de réparation n'est pas aspécifique, les mêmes dilutions (1X) sont incubées dans les mêmes conditions sur du pBS<sup>UV</sup>. Une dilution ne présentera un effet protecteur que si l'on note un abaissement du signal de réparation, à cette dilution, en présence de bleu de méthylène, et une absence de modification du signal sur le pBS<sup>UV</sup>. Une inhibition  
15 du signal de réparation contrôle du pBS<sup>UV</sup> peut par exemple être expliquée par une interaction directe de l'échantillon avec l'ADN qui bloque l'accès des lésions aux enzymes de réparation.

Ces différentes dilutions ont été incubées sur de l'ADN non endommagé  
20 (pBS) et éclairées en l'absence de bleu de méthylène. Ce test permet de vérifier que le produit testé n'est pas génotoxique.

**Tableau 9**

Composé testé	Dilution ou Concentration	% d'inhibition spécifique	% d'inhibition aspécifique
L 70 (%)	0,01	19	3
	0,1	96	6
	1	92	28
L100 (%)	0,01	58	4
	0,1	54	6
	1	69	52
huile de lupin raffinée (%)	0,01	56	27
	0,1	45	43
	1	62	24
Témoin (%)	0,01	45	0
	0,1	53	(+2)
	1	45	0
Propylène glycol (%)	0,01	0	2
	0,1	6	6
	1	13	7

#### 4. Résultats

5 Ils sont exprimés comme le pourcentage d'inhibition de réparation résiduelle. La valeur 0% correspond au signal de réparation dans la condition de traitement bleu de méthylène seul.

De même, une inhibition du signal de réparation peut être parfois observée de façon aspécifique (en absence de ROS), ceci pouvant être dû à une interaction  
 10 directe du composé avec l'ADN (désorption de l'ADN du puits, association aspécifique avec l'ADN qui va masquer les lésions aux enzymes de réparation...). Un contrôle consistant à incuber les agents testés avec de l'ADN prélysé est donc ajouté. Une diminution du signal dans cette condition reflète une inhibition  
 15 aspécifique du composé, indépendante de ses possibles propriétés de protection de l'ADN contre des dommages oxydatifs.



Les valeurs données dans le Tableau 9 sont calculées à partir des valeurs en RLU, comme suit :

Le pourcentage d'inhibition spécifique est calculé comme la baisse relative de l'effet lésionnel dû aux oxygènes singulets générés par le bleu de méthylène (BM) éclairé, soit

$$\frac{[\text{RLU BM}] - [\text{RLU BM} + \text{test de dilution}]}{[\text{RLU BM}]} \times 100$$

10

RLU : Relative Light Unit ; unité arbitraire de quantité de lumière

BM : condition bleu de méthylène + lumière.

L'effet protecteur d'un composé est d'autant plus fort que son inhibition des dommages créés par l'oxygène singulet est fort, mais il est nécessaire de tenir compte pour l'interprétation de ces résultats de l'aspécificité d'inhibition du signal.

Le propylène glycol, utilisé comme contrôle interne ne présente de lui-même que de très faibles propriétés protectrices, peu significatives, vis-à-vis de l'oxygène singulet. Son effet est donc négligeable et il constitue donc le contrôle négatif.

Le composé L70 présente ainsi des propriétés protectrices certaines vis-à-vis de l'oxygène singulet. Son effet aspécifique est faible.

L'efficacité du composé L100 est également satisfaisante.

En ce qui concerne l'huile de lupin raffinée, une forte aspécificité aux trois doses testées ne permet pas de conclure avec certitude sur son efficacité.

Le témoin ne présente pas d'effet-dose, mais ne montre pas, par contre, d'aspécificité.

Enfin, aucun des produits testés n'apparaît génotoxique car aucune élévation du signal de réparation n'a été observée suite à une incubation des produits sur l'ADN.

**REVENDICATIONS**

1. Composition contenant de l'huile de lupin ou une ou plusieurs fraction de celle-ci.
- 5 2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que ladite huile de lupin est extraite à partir de farine et/ou de graines de lupin.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite fraction est un concentrat d'huile de lupin, obtenu par distillation moléculaire de ladite huile.
- 10 4. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite fraction est une fraction insaponifiable contenue dans un concentrat obtenu par distillation moléculaire de ladite huile.
- 15 5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que la quantité en poids de la fraction insaponifiable dans le concentrat d'huile de lupin est d'environ 30 % à environ 70 % , de préférence d'environ 45 % environ à 65 %.
- 20 6. Composition caractérisée en ce qu'elle contient des dérivés polyphénoliques extraits de l'huile de lupin.
7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle contient une fraction d'huile de lupin contenant des dérivés phénoliques.
- 25 8. Composition selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce que la teneur en dérivés phénoliques est au moins égale à 20ppm.
9. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle contient de l'huile de germe de blé ou une ou plusieurs fractions de celle-ci.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite fraction d'huile de germe de blé est un concentrat obtenu par distillation moléculaire de ladite huile.
11. Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite fraction d'huile de germe de blé est une fraction insaponifiable contenue dans un concentrat obtenu par distillation moléculaire de ladite huile.
12. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle contient un concentrat d'huile de germe de blé en mélange avec de l'huile de lupin.
13. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que les quantités en poids de concentrat d'huile de germe de blé et d'huile de lupin varient respectivement entre environ 10 % à environ 90 %, et entre environ 90 % à environ 10 %, de manière à ce que le total des quantités de ces deux huiles fasse 100 %.
14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que les quantités en poids de concentrat d'huile de germe de blé et d'huile de lupin sont respectivement de 30 % et de 70 %.
15. Utilisation cosmétique d'une composition selon l'une des revendications 1 à 14, notamment comme agent anti-radicalaire, anti-élastase, protecteur UVA et/ou UVB, protecteur de l'ADN contre des dommages, notamment oxydatifs.
16. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend une composition selon l'une des revendications 1 à 15.
17. Composition cosmétique selon la revendication 16, susceptible d'être utilisée notamment en tant que produit solaire protecteur des UVB et/ou A et/ou rayonnement infra-rouge, crème restructurante, raffermissante, produit, notamment crème pour la prévention et la régression des vergetures, crème nutritive, antiride (lutte contre le vieillissement de la peau épiderme et derme) et protectrice de jour,

contour des lèvres et des yeux, sticks labiaux régénérants et protecteurs de préférence en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

- 5 18. Composition selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour l'usage topique, notamment sous forme de crème, d'émulsion, de pommade, de stick ou de gel.
- 10 19. Méthode de traitement cosmétique, caractérisés en ce qu'elle comprend l'application d'une composition selon l'une des revendications 1 à 14 ou 16 à 18 sur la surface cutanée d'un individu.
- 20 20. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, à titre de produit pharmaceutique.
- 15 21. Composition selon l'une des revendications 1 à 14 à titre d'agent destiné à la prévention ou au traitement des effets des UVA et/ou UVB sur la peau aux niveaux épidermique, dermique, cellulaire ou extra-cellulaire.
- 20 22. Composition selon l'une des revendications 1 à 14 à titre d'agent ayant une activité inhibitrice de l'élastase.
23. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, à titre d'agent ayant une activité anti-radicalaire.
- 25 24. Composition selon l'une des revendications 1 à 14 à titre d'agent ayant une activité de protection de l'ADN contre des dommages notamment oxydatifs.
25. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisée en ce qu'elle est en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.
- 30 26. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 14 à titre d'agent anti oxydant.

27. Complément alimentaire, caractérisé en ce qu'il comprend une composition selon l'une des revendications 1 à 14.
- 5 28. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'on prépare un concentrat d'huile de germe de blé par distillation moléculaire et on le mélange à de l'huile de lupin.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2762512

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 543849  
FR 9705067

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP 0 441 672 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE)  * colonne 1, ligne 16 - ligne 20 * * colonne 5, ligne 59 - colonne 6, ligne 10; revendications 1-13 * ---	1-8,16, 18-20, 25,27
X	STN, Serveur de bases de données, XP002052109 Karlsruhe, DE, Fichier Chemical Abstracts, vol 102, AN=77429 * résumé *	1-8,27
X	STN, Serveur de Bases de Données, XP002052110 Karlsruhe, DE, Fichier Chemical Abstracts, vol 101, AN=150094 * résumé *	1-8,27
X	EP 0 302 769 A (SYNTHELABO) * le document en entier *	1-8,27
X	DE 21 55 727 A (REICHOLD-ALBERT-CHEMIE AG) * le document en entier *	1-8,16, 18-20,25
X	DE 33 29 249 A (SKW TROSTBERG AG) * page 19, ligne 26 - ligne 35; exemple 2 *	1,27
A,D	FR 2 692 783 A (EXPANCHIMIE) * le document en entier *	1-28
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.8)
		A61K A23L
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 janvier 1998		Fischer, J.P.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 03.82 (90&C13)